and a caudal disposition. The roof of the mouth is secondary from the beginning. So there are no primary choanae, but only paired secondary and in earlier stages paired tertiary choanae. With embryos of *Crocodylus* with an 8 mm long head there is an unpaired tertiary choana which is deplaced in orocaudal direction into the region of the pterygoids.

WICHTIGSTE LITERATUR

Bertau, M. 1935. *Zur Entwicklungsgeschichte des Geruchsorgans der Krokodile.* Zeitschr. f. Anat. u. Entw.geschichte. Bd. 104, Berlin.

Fuchs, H. 1907. *Untersuchungen über Ontogenie und Phylogenie der Gaumenbildung bei den Wirbeltieren.* Zeitschr. f. Morphol. u. Anat. Bd. 11, Stuttgart.

Meek, A. 1911. *On the morphogenesis of the head of the crocodile.* Journ. of Anat. and Physiol. Vol. XLV, London.

Shino, K. 1914. *Das Chondrocranium von Crocod. porosus.* Anatom. Hefte. Bd. 50, Wiesbaden.

Voeltzkow, A. 1902. *Beiträge zur Entwicklungsgeschichte der Reptilien.* Abhandlungen d. Senckenbergischen naturforsch. Gesellsch., Frankfurt a.M.

N° 30. **G. Ortolani et F. Vanderhaeghe.** — L'activation de l'œuf de *Xenopus laevis laevis.*

Station de Zoologie expérimentale, Université de Genève.

Introduction

Chez les Amphibiens, comme chez d'autres Vertébrés, l'œuf est pondu après la première division de maturation et l'émission du premier globule polaire. Le noyau reste ensuite en métaphase jusqu'au moment où l'œuf est fécondé ou activé artificiellement; c'est alors seulement que le second globule polaire est expulsé et que le développement de l'embryon devient possible.

L'activation artificielle de l'œuf chez les Amphibiens peut s'opérer de diverses manières. La plus connue est celle de Bataillon [1, 2] qui consiste à piquer l'œuf avec une aiguille très fine;

mais le choc thermique [3] ou la décharge électrique [4] peuvent être utilisés très efficacement aussi.

Dans les expériences de transplantation nucléaire chez *Rana pipiens* [5], chez *Pleurodeles Waltlii* [6] ou chez l'Axolotl [4], l'injection du noyau est toujours précédée de l'activation artificielle de l'œuf et de son énucléation. Chez *Xenopus laevis* [7], par contre, celle-ci n'est pas nécessaire. En fait, l'activation est généralement spontanée et se produit dans les cinq à dix minutes qui suivent la ponte.

L'objet de cette note est l'étude de cette activation spontanée de l'œuf de *Xenopus laevis* et des manifestations qui l'accompagnent, dans le but particulier de mieux estimer les causes des échecs du développement de l'œuf transplanté.

Matériel et méthodes

Les observations ont porté sur des pontes spontanées et des pontes provoquées par l'injection d'hormone gonadotrope (50 à 400 UI de Gonadotropine chorionique de Ciba) de *Xenopus laevis laevis* (Daudin). Les pontes spontanées sont en fait assez rares chez ces animaux en captivité. Sur quinze crapauds isolés pendant deux à cinq semaines, trois pontes spontanées seulement ont été dénombrées. Elles se produisent d'ailleurs aussitôt après l'isolement des femelles qui, dans le laboratoire, vivent habituellement par groupes de vingt dans un aquarium. Les phénomènes qui accompagnent l'activation de l'œuf ont été observés *in vivo* et sur des œufs fixés au Zenker à différents moments après la ponte.

La fixation au Zenker dure deux heures et est suivie d'un lavage à l'eau courante pendant vingt-quatre heures. La déshydratation s'opère dans des mélanges eau-éthanol-butanol normal, avant l'inclusion dans une paraffine à point de fusion de 52° C.

Les coupes de 10 μ ont été colorées soit à l'Hémalun de Mayer pendant huit minutes et postcoloration à l'éosine, soit au Feulgen pendant une heure et demie, après une hydrolyse de huit minutes par l'HCl N à 60° C, soit par le mélange d'Unna [8] pendant vingt minutes avec une différenciation dans l'alcool 96° de cinq minutes. Ces trois méthodes mettent bien en évidence le noyau en division, mais seul l'Hémalun de Mayer colore bien le noyau interphasique. L'Unna sert surtout à révéler la basophilie cytoplasmique.

Résultats et conclusions

L'œuf vierge qui vient d'être pondu, présente un pôle animal pigmenté et un pôle végétal blanc-grisâtre avec une zone sous-équatoriale plus blanche. Si l'œuf est mûr, c'est-à-dire si sa vésicule germinale s'est rompue, le pôle animal présente une zone dépigmentée en son centre: la tache polaire (fig. 1*A*). C'est dans celle-ci que deux à dix minutes après la ponte apparaît une petite plage translucide (fig. 1*B*) qui correspond, comme le montrent les préparations histologiques des œufs fixés à ce stade, à l'affleurement du fuseau de la deuxième division de maturation. La présence dans ces préparations d'un globule polaire, retenu dans une fossette entre le cortex et la membrane vitelline à proximité d'un noyau en métaphase (fig. 2) indique qu'il s'agit de la deuxième division de maturation. Le fuseau est dépourvu d'asters et les chromosomes sont réunis en une plaque équatoriale.

Entre cinq et dix minutes après la ponte, l'œuf non fécondé et non activé artificiellement s'oriente, son pôle animal vers le haut; il subit en même temps une contraction. Ceci correspond évidemment à l'activation de l'œuf, puisqu'un espace périvitellin apparaît à ce moment. La contraction de l'œuf se caractérise par un mouvement cortical qui a comme effet de concentrer le pigment au pôle animal. En même temps, la tache polaire se rétrécit (fig. 1*B*). La contraction dure dix à vingt minutes selon les pontes; ensuite, l'œuf se décontracte et le pigment regagne l'équateur.

L'émission du second globule polaire se produit généralement vers la fin de la contraction, parfois pendant la décontraction de l'œuf (fig. 1*C*). Les préparations histologiques des œufs contractés montrent régulièrement les différents stades de la diacinèse.

Une heure et demie à deux heures après la contraction, l'œuf amorce une série de faux-clivages (fig. 1*D*). Ceux-ci sont parfois très réguliers mais n'intéressent que la zone corticale de l'œuf. Les coupes histologiques montrent qu'il n'y a en fait pas d'asters, ce qui explique que le sillon reste superficiel. Les chromosomes, probablement en nombre supérieur au nombre haploïde, restent groupés au sein d'un amas de fibres comparables à celles d'un fuseau. Des plages dépourvues de plaquettes vitellines et remplies de fibres sont visibles dans différentes régions de l'œuf, indiquant, semble-t-il,

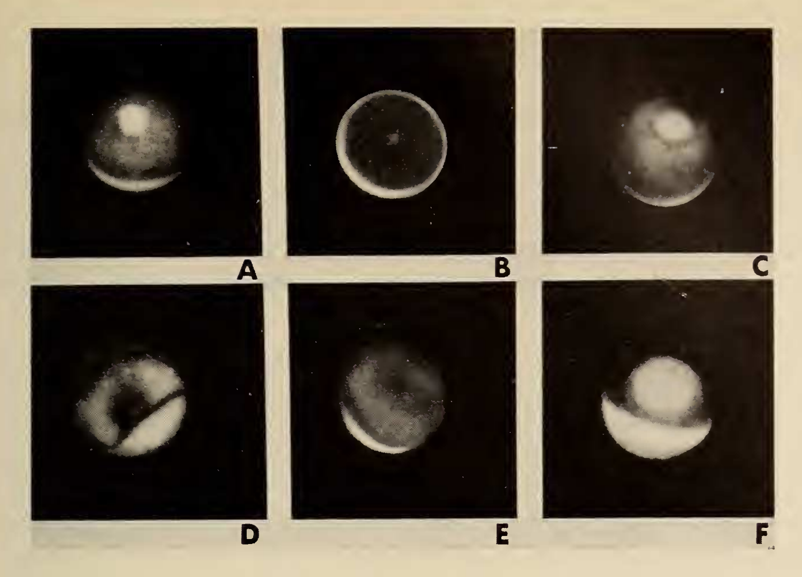


Fig. 1.

A) Œuf mûr quelques secondes après la ponte: la tache polaire est visible au centre du pôle animal pigmenté.
B) Œuf contracté dix minutes après la ponte: au milieu de la tache polaire, rétrécie, la plage translucide du fuseau de maturation.
C) Œuf décontracté trente minutes après la ponte: au centre de la tache polaire le globule polaire déjà émis.
D) Faux clivage, deux heures après la ponte.
E) Œuf immature: pôle animal sans tache polaire.
F) Même œuf trois heures après la ponte: la vésicule germinale fait hernie à la surface.

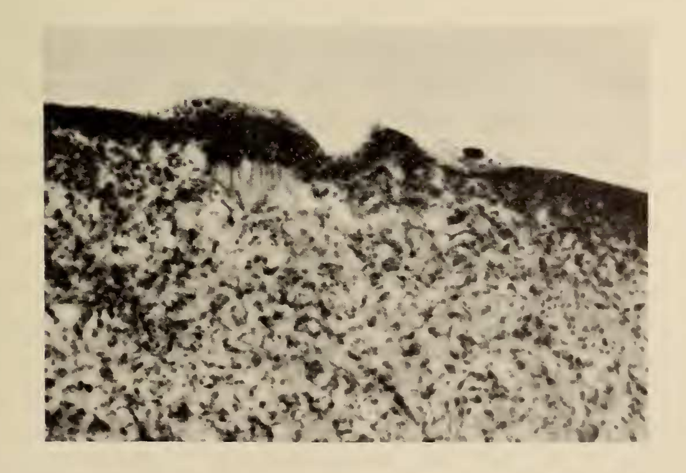


Fig. 2.

Œuf fixé au début de la contraction, montrant le premier globule polaire et le noyau en métaphase.
Coloration à l'Hemalun de Mayer-éosine. Coupe 11 μ — 700 $\times$.

qu'il y a eu plusieurs fuseaux abortifs. Trois ou quatre heures après la ponte, l'œuf non fécondé se cytolyse.

Les phénomènes décrits jusqu'ici caractérisent aussi bien les pontes spontanées que les pontes provoquées par l'injection de différentes doses d'hormones gonadotropes (50-200-400 UI). Cependant, ceux-ci ne se manifestent pas toujours dans toutes les pontes ni dans tous les œufs d'une même ponte.

Il arrive que des œufs d'apparence normale, ayant une tache polaire, ne se contractent pas et gardent leur fuseau jusqu'à la cytolyse sans produire de globule polaire, ni subir de faux clivages. De tels œufs peuvent être activés artificiellement au moyen d'une piqûre ou par un choc froid; par contre, l'irradiation ultraviolette ou une augmentation de la teneur en Ca du milieu sont sans effet. Plus rarement, des œufs, aussitôt après la ponte, montrent encore le premier globule polaire au milieu de la tache polaire; quelques minutes ou même une heure après, ils émettent le second globule. De tels œufs sont incapables de se contracter: leur cytoplasme n'a probablement pas subi l'indispensable préparation à l'activation décrite par Dettlaff et al. [9] alors que leur noyau poursuivait son évolution normale.

Lorsque les œufs ne présentent pas de tache polaire (fig. 1*E*) au moment de la ponte, leur vésicule germinale est intacte; ils sont incapables de se contracter après piqûre ou de se développer après l'injection d'un noyau de blastula. Ceci concorde avec ce qui a été observé par Dettlaf et al. [9] chez *Bufo bufo asiaticus* et *Bufo viridis.* Environ trois heures après la ponte, la vésicule germinale apparaît à la surface de l'œuf où elle fait hernie (fig. 1*F*). Des œufs sans tache polaire sont parfois capables de se contracter sans qu'aucun globule polaire soit expulsé: ce phénomène observé aussi chez l'Axolotl par Signoret, Briggs et Humphrey [4] est interprété par ces auteurs comme une activation incomplète de l'œuf.

En conclusion, il faut admettre, comme Gurdon [10] l'avait suggéré, que la contraction du pigment qui se produit dans les œufs de *Xenopus laevis* correspond à l'activation et que celle-ci se produit spontanément dans la plupart des cas. La présence de la tache polaire et la contraction du pigment sont certainement les meilleurs critères de la capacité de développement d'un œuf puisqu'ils indiquent non seulement que la vésicule germinale s'est rompue et

que le noyau a subi son évolution, mais aussi que le cytoplasme est capable de se diviser.

Il apparaît aussi que le moment où l'œuf se contracte est le plus favorable pour l'énucléation de celui-ci par irradiation ultraviolette. C'est, en effet, à ce moment-là que le noyau affleure au pôle animal, prêt à émettre le second globule polaire.

Résumé

L'œuf non fécondé de *Xenopus laevis* est activé spontanément quelques minutes après la ponte. Cette activation s'accompagne d'une contraction de l'œuf et de l'émission du deuxième globule polaire. L'œuf activé subit, une heure et demie à deux heures après l'activation (à 22° C), une série de clivages abortifs.

Les causes de l'activation spontanée des œufs n'ont pu être déterminées, bien que l'on ait pu exclure celle d'une influence de l'injection directe d'hormones gonadotropes dans l'animal. Une analyse cytologique des différents stades de l'activation a été effectuée.

Summary

The unfertilized egg of *Xenopus laevis* is spontaneously activated several minutes after being laid. This activation is accompanied by a contraction of the egg and the emission of the second polar body. One and a half hours after activation (at 22° C.), the activated egg undergoes a series of abortive cleavages.

The causes of spontaneous activation of eggs could not be determined, although we could exclude the influence of direct injection of gonadotrophic hormones in to the animal. A cytological analysis of different stages of activation was made.

Remerciements

Nous remercions le professeur M. Fischberg, directeur de la Station de Zoologie expérimentale, pour son hospitalité et M[lle] G. Lasterie pour son aide technique très précieuse.

Ce travail a été effectué grâce à l'obtention d'une bourse NATO du Consiglio Nazionale delle Ricerche par l'une de nous (G. O.) et à un subside du Fonds national de la Recherche scientifique suisse.

BIBLIOGRAPHIE

Bataillon, E. 1910. *L'embryogenèse provoquée chez les Amphibiens par piqûre de l'œuf vierge, larves parthénogénétiques de Rana fusca.* C. R. Acad. Sci. 150: 996.

2. — 1919. *Analyse de l'activation par la technique des œufs et la polyspermie expérimentale chez les Batraciens.* Ann. Sci. Nat. Zool. 3: 1.
3. Signoret, J. et J. Fagnier. 1962. *Activation expérimentale de l'œuf de Pleurodèle.* C. R. Acad. Sci. 254: 4079.
4. Signoret, J., R. Briggs and R. R. Humphrey. 1962. *Nuclear transplantation in the Axolotl.* Dev. Biol. 4: 134.
5. Briggs, R. and T. J. King. 1953. *Factors affecting the transplantability of nuclei of frog embryonic cells.* J. exper. Zool. 122: 485.
6. Signoret, J. et B. Picheral. 1962. *Transplantation des noyaux chez Pleurodèles Waltlii Michah.* C. R. Acad. Sci. 254: 1150.
7. Elsdale, T. A., J. B. Gurdon and M. Fischberg. 1960. *A description of the technique for nuclear transplantation in Xenopus laevis.* J. Embryol. exp. Morph. 8: 437.
8. Brachet, J. 1940. *La détection histochimique des acides pentose-nucléiques.* Compt. Rend. Soc. Biol. 133: 88.
9. Dettlaff, T. A., L. A. Nikita and O. G. Stroeva. 1964. *The rôle of the germinal vesicle in oöcyte maturation in anurans as revealed by the removal and transplantation of nuclei.* J. Embryol. exp. Morph. 12: 851.
10. Gurdon, J. B. 1960. *Factors responsible for the abnormal development of embryos obtained by nuclear transplantation in Xenopus laevis.* J. Embryol. exp. Morph. 8: 327.

N° 31. **A. Portmann,** Basel. — Über die Evolution der Tragzeit bei Säugetieren.

Zoologische Anstalt der Universität, Basel.

Unter den Fragen, welche die Stammesgeschichte der Säugetiere uns aufgibt, ist die nach der Entstehung ihrer besonderen Ontogenese nicht die geringste. Die paläontologischen Dokumente helfen uns wenig; umso wichtiger wird die vergleichend morphologische Untersuchung. Einen Beitrag zu einer Antwort möchte die nach-